THE SKIN MYCOBIOME IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND HEALTHY INDIVIDUALS

Z. Bakuła[1], P. Decewicz[2], J. Gawor[3], A. Jankowska-Konsur[4], A. Hryncewicz-Gwóźdź[4], M. Dyląg[5], R. Gromadka[3], T. Jagielski[1]

[1]Department of Applied Microbiology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland
[2]Department of Bacterial Genetics, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, Warsaw, Poland
[3]DNA Sequencing and Oligonucleotide Synthesis Laboratory, Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Science, Warsaw, Poland
[4]Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Faculty of Medicine and Dentistry, Wroclaw Medical University, Wrocław, Poland
[5]Institute of Genetics and Microbiology, University of Wroclaw, Wrocław, Poland

INTRODUCTION

Atopic dermatitis (AD) is a complex chronic inflammatory disease in which fungi are believed to act as aggravating factors. Thus, analysis of the composition of skin mycoflora is crucial for a better understanding of the etiology of AD.

OBJECTIVE

The aim of the study was to explore the skin mycobiome of AD patients and healthy volunteers using culture-independent metagenomic sequencing.

METHODS

The study included 49 AD patients (24 woman, 25 men; mean age: 31.8 ± 13.1) and 50 healthy individuals (39 woman, 11 men; mean age: 37.8 ± 14.3) recruited between 2017 and 2019 at the Department of Dermatology, Venereology and Allergology, Wroclaw Medical University. Samples from the creases of the elbows (AD patients with acute skin lesions on elbows, *n* = 44 and all healthy individuals) or neck/knee bending (AD patients with no acute lesions on elbows, with lesions on neck/knee bending; *n* = 6) were collected with either a scalpel (AD subjects) or OpSite dressings (Smith & Nephew Education; UK) (healthy individuals; **Fig. 1**). DNA was isolated using GeneMATRIX Environmental DNA & RNA Purification Kit (EurX; Poland). Metagenomic sequencing was performed using primers FungITS1 and FungITS2 (**Fig. 2**), as described previously (Fraczek et al., 2017, J Allergy Clin Immonol. 9:39) at the DNA Sequencing and Oligonucleotide Synthesis Laboratory, Polish Academy of Science.

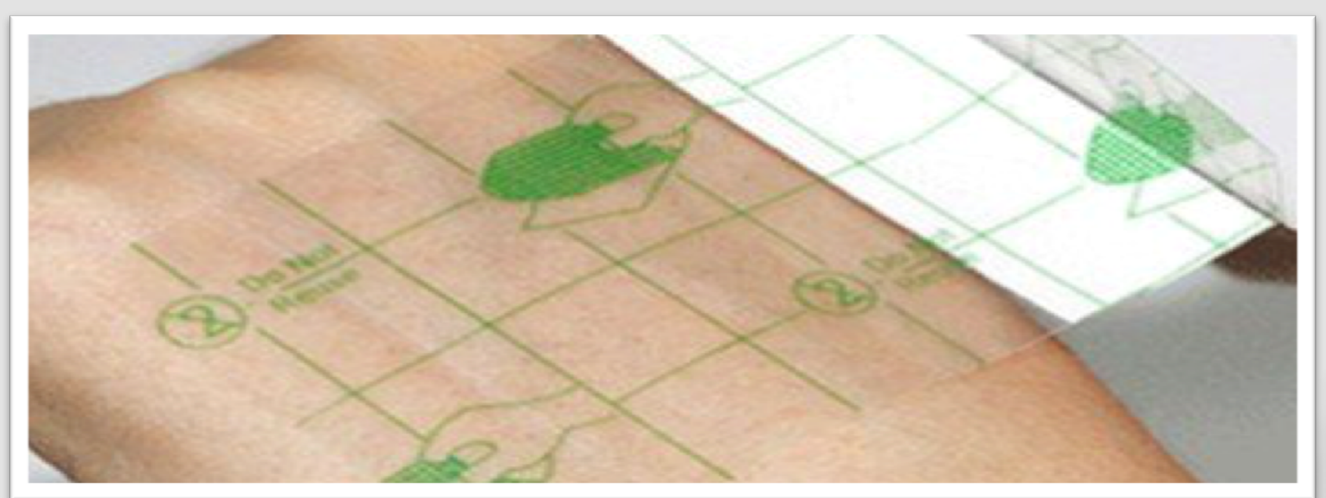

Fig.1 Sample collection. Material from healthy individuals was obtained with an OpSite dressing.

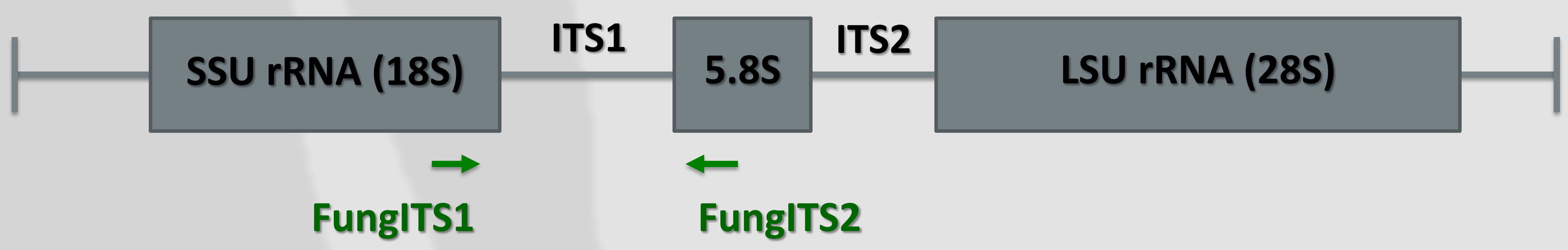

Fig.2 Schematic representation of fungal rDNA operon. Major rRNA genes are shown as boxes. Primers used for PCR amplification are marked in green. SSU, small subunit; LSU, large subunit; ITS, internal transcribed spacer.

RESULTS

A total of **61** and **44** (considering the abundance above 1% within samples) various taxonomic fungal families were found on the skin of AD patients and healthy individuals, respectively. In both groups, the most abundant were fungi of Trichosporonaceae, Cladosporiaceae, Debaryomycetaceae, Malasseziaceae and Saccharomycetales. Among patients with AD, five families, i.e. Cladosporiaceae, Debaryomycetaceae, Malasseziaceae, Saccharomycetales and Botryosphaeriaceae were represented at a higher frequency, when compared with healthy individuals. On the contrary, among healthy subjects Thermoascaceae family was overrepresented.

Class	Family	2ZL	3ZL	4ZL	5ZL	6ZL	7ZL	8ZL	9K	10ZL	11ZL	12ZL	13ZL	14ZL	15ZL	16ZL	17K	18ZL	19ZL	20ZL	21K	22ZL	23ZL	24ZL	25ZL
Dothideomycetes	Botryosphaeriaceae	4,4	4,4		0,8		2,0	7,3	1,8	0,5										0,8					
	Capnodiales (Is)																								
	Cladosporiaceae	9,7	60,4	8,9	69,9	53,0	41,6	47,0	38,6	5,2	10,9		4,1		9,9	0,6				1,6	2,1				
	Mycosphaerellaceae	1,6	6,9	0,8	1,1		1,6	0,9	5,3	3,4			0,6		2,8						0,6			5,5	
	Teratosphaeriaceae																								
	Aureobasidiaceae						3,0																		
	Dothideaceae														1,1										
	Dothioraceae																								
	Dothideales (ni)																								
	Cucurbitariaceae																								
	Didymellaceae										0,8		1,5		0,7							1,2			
	Lentitheciaceae													0,6			2,7						0,5		
	Montagnulaceae			59,7																					
	Pleosporaceae		1,8					0,7				0,6		0,8			3,6	0,7	0,7		6,9	1,4	0,8	1,0	1,9
	Pleosporales (ni)							0,5													0,8				
	Venturiaceae																			0,6					
Eurotiomycetes	Herpotrichiellaceae				0,5					0,8	2,0		1,1								3,9				
	Trichomeriaceae														1,2										
	Chaetothyriales (ni)																				2,9				
	Aspergillaceae	3,6	3,7	0,6	1,6	11,3	4,1	2,3	2,4	9,0	0,7		1,3		2,9	4,1					4,8	0,6			
	Thermoascaceae										1,3	8,1	0,5	7,4			2,8	9,6	8,3	0,8		0,8	4,2	4,1	5,6
Leotiomycetes	Erysiphaceae																								
	Helotiaceae		0,8																		1,6				
	Helotiales (Is)		0,8																						
	Hyaloscyphaceae						2,6						0,7												
	Sclerotiniaceae														0,6	0,7									
	Leotiomycetes (ni)	1,0																							
Saccharomycetes	Debaryomycetaceae	8,8	9,7	4,0	4,7	15,5	10,4	13,9	10,1	2,4	39,0		16,2		31,2	19,5				15,1	21,8	3,4			
	Phaffomycetaceae																								
	Pichiaceae																1,1								
	Saccharomycetaceae	12,2			1,3				0,7	0,8	5,4		1,1		0,5	1,2				1,1	0,7				
	Saccharomycetales (Is)	23,3		1,1	6,6	3,4	2,4	1,9	2,8	9,5	8,0		45,7		32,0	47,3			9,9	60,4	7,1	85,2		0,7	
	Saccharomycodaceae																								
Sordariomycetes	Clavicipitaceae						0,6																		
	Hypocreaceae											1,1		1,1			5,6	1,0	0,9				2,1	1,4	1,3
	Hypocreales (Is)	1,1																							
	Hypocreales (ni)																								
Taphrinomycetes	Taphrinaceae																			1,4					
Ascomycota (ni)				15,8																					
Agaricomycetes	Clavariaceae															0,9									
	Physalacriaceae					1,7																			
	Pleurotaceae																								
	Schizophyllaceae										0,7														
	Strophariaceae														1,0								0,7		
	Tricholomataceae		0,6													0,6									
	Amylocorticiaceae						1,3																		
	Atheliaceae																								
	Boletaceae																								
	Tapinellaceae																								
	Ceratobasidiaceae																			1,2					
	Hymenochaetales (Is)																								
	Coriolaceae					1,0															3,0				
	Fomitopsidaceae				0,6																				
	Meruliaceae																								
	Xenasmataceae																								
	Polyporales (ni)														1,2										
	Peniophoraceae															1,0									
	Russulales (ni)																								
	Agaricomycetes (ni)															1,3									
Cystobasidiomycetes	Buckleyzymaceae				0,5																	1,3			
	Symmetrosporaceae												1,8												
Malasseziomycetes	Malasseziaceae	14,5	6,0	5,7	7,9	6,1	14,3	18,0	31,6	50,9	22,4		2,9		1,8	3,4				0,8	31,6				
	Malasseziales (ni)						0,8																		
Microbotryomycetes	Leucosporidiaceae										0,8														
	Sporidiobolaceae	7,9					0,8	0,8			1,8		18,0		4,3	14,9				13,1	4,9	4,9			
Tremellomycetes	Cystofilobasidiaceae														1,0										
	Mrakiaceae		0,8								1,5					0,6									
	Filobasidiaceae								0,5	2,2	0,9														
	Piskurozymaceae						8,8																		
	Bulleraceae						0,9			4,4											0,5				
	Bulleribasidiaceae																								
	Tremellaceae														1,9										
	Trichosporonaceae											88,5		88,8			81,7	86,7	78,4				89,4	85,5	88,9
Fungi (ni)		8,6	3,8	1,3	2,7	6,5	3,2	5,0	3,0	7,1	3,4		4,5		5,3	3,6	2,4	0,5		2,3	5,7		0,6		0,7
Other (below 1%)		3,1	0,4	2,0	1,9	1,6	1,6	1,5	3,2	4,0	0,6	1,2	0,1	0,7	0,7	0,5	0,2	1,4	1,4	0,9	1,2	1,0	1,7	1,3	1,6

Class	Family	26ZL	27ZL	28ZL	29ZL	30ZL	31ZL	32ZL	33ZL	34ZL	35ZL	36ZL	37ZL	38K	39ZL	41ZL	42ZL	43ZL	44ZL	45ZL	46ZL	47ZL	48ZL	49K	50K	PNZL
Dothideomycetes	Botryosphaeriaceae																									
	Capnodiales (Is)																									
	Cladosporiaceae																									
	Mycosphaerellaceae			0,6									4,0					4,4								
	Teratosphaeriaceae																									
	Aureobasidiaceae																									
	Dothideaceae																									
	Dothioraceae									2,9																
	Dothideales (ni)																	0,6								
	Cucurbitariaceae																									
	Didymellaceae																									
	Lentitheciaceae		1,2					0,6	0,7	0,6	0,7	0,6		0,7	0,6	0,6				0,6	1,6		0,6		0,7	
	Montagnulaceae																									
	Pleosporaceae		1,2	1,0	1,1	0,7	1,0	1,0	1,1	1,2	0,9	0,8	0,7	1,1	0,8	0,9		0,6	0,6	1,1	2,2	1,3	0,8	0,9	1,2	
	Pleosporales (ni)																									
	Venturiaceae																									
Eurotiomycetes	Herpotrichiellaceae																									
	Trichomeriaceae																									
	Chaetothyriales (ni)																									
	Aspergillaceae																		0,8							
	Thermoascaceae		2,3	3,2	4,6	3,6	2,0	2,8	3,2	3,0	2,5	3,4	3,2	3,6	2,8	3,0	3,9	1,8	2,9	1,8	1,7	2,6	2,1	1,8	2,4	1,9
Leotiomycetes	Erysiphaceae																									
	Helotiaceae																									
	Helotiales (Is)																									
	Hyaloscyphaceae																									
	Sclerotiniaceae																						0,8			
	Leotiomycetes (ni)																									
Saccharomycetes	Debaryomycetaceae																									0,6
	Phaffomycetaceae																									
	Pichiaceae		0,6																		1,0					
	Saccharomycetaceae					0,6							20,2	6,1	0,7											
	Saccharomycetales (Is)															0,5		33,7								
	Saccharomycodaceae																									
Sordariomycetes	Clavicipitaceae																									
	Hypocreaceae		1,5	1,8	1,1	1,5	1,2	1,6	1,4	1,3	1,6	1,9	0,8	1,4	1,8	1,1	0,7		1,1	1,4	3,6	1,3	1,0	1,7	1,5	
	Hypocreales (Is)																									
	Hypocreales (ni)																									
Taphrinomycetes	Taphrinaceae																									
Ascomycota (ni)																										
Agaricomycetes	Clavariaceae																									
	Physalacriaceae																									
	Pleurotaceae																									
	Schizophyllaceae																									
	Strophariaceae																									
	Tricholomataceae																									
	Amylocorticiaceae																									
	Atheliaceae																									
	Boletaceae																							0,8	4,2	
	Tapinellaceae																									
	Ceratobasidiaceae																									
	Hymenochaetales (Is)																									
	Coriolaceae																									
	Fomitopsidaceae																									
	Meruliaceae														1,1											
	Xenasmataceae																									
	Polyporales (ni)																									
	Peniophoraceae																									
	Russulales (ni)																									
	Agaricomycetes (ni)																									
Cystobasidiomycetes	Buckleyzymaceae																									
	Symmetrosporaceae																									
Malasseziomycetes	Malasseziaceae																	7,8								
	Malasseziales (ni)																									
Microbotryomycetes	Leucosporidiaceae																									
	Sporidiobolaceae															1,2	1,1			2,2			1,2	1,2		
Tremellomycetes	Cystofilobasidiaceae																									
	Mrakiaceae																									
	Filobasidiaceae																	5,5								
	Piskurozymaceae																									
	Bulleraceae																									
	Bulleribasidiaceae	2,0																								
	Tremellaceae																									
	Trichosporonaceae		91,7	90,7	90,9	92,1	93,5	93,0	91,6	89,4	88,6	90,1	67,5	84,2	90,6	90,1	91,2	41,2	92,1	91,4	87,3	93,1	91,2	90,6	87,0	76,0
Fungi (ni)		97,1	0,8	1,0	0,5		0,8		0,6		3,9	1,1	1,4	0,9	0,6	0,5	0,9	0,6	0,6	0,7	2,0	0,6	0,7		0,7	18,7
Other (below 1%)		0,8	0,7	1,7	1,8	1,3	1,5	0,6	1,4	1,2	1,6	2,1	2,1	1,9	1,2	2,1	2,1	3,9	1,9	0,7	0,7	1,3	1,5	2,5	2,2	2,8

Class	Family	1ZLK	2ZLK	3ZLK	4ZLK	5ZLK	6ZLK	7ZLK	8ZLK	9ZLK	10ZLK	11ZLK	12ZLK	13ZLK	14ZLK	15ZLK	16ZLK	17ZLK	18ZLK	19ZLK	20ZLK	21ZLK	22ZLK
Dothideomycetes	Botryosphaeriaceae											0,6											
	Capnodiales (Is)																						
	Cladosporiaceae														1,5		1,6						
	Mycosphaerellaceae	2,5				0,7				5,2			2,8	1,0	0,9								
	Teratosphaeriaceae																						
	Aureobasidiaceae																					0,5	
	Dothideaceae																						
	Dothioraceae																						
	Dothideales (ni)																						
	Cucurbitariaceae																						
	Didymellaceae														1,1								
	Lentitheciaceae		0,6		0,5	5,2	0,7		0,8	0,8	0,8	2,4	0,5	0,5			0,6	0,7			0,5		
	Montagnulaceae																						
	Pleosporaceae	1,5	1,4	1,6	1,0	9,8	0,9	1,4	1,5	1,3	1,7	8,7	1,1	0,8	0,7	1,1	1,0	1,3	0,6	0,8	1,0		0,7
	Pleosporales (ni)																						
	Venturiaceae																						
Eurotiomycetes	Herpotrichiellaceae																						
	Trichomeriaceae																						
	Chaetothyriales (ni)																						
	Aspergillaceae					0,9		1,6	1,1	3,2		17,5	2,5	1,4	0,7								
	Thermoascaceae	2,5	3,4	2,6	3,2	26,3	2,9	4,1	4,4	2,5	3,1	15,3	3,1	2,2	2,4	3,7	3,5	3,8	2,7	3,6	3,9	2,8	3,6
Leotiomycetes	Erysiphaceae														0,7								
	Helotiaceae																						
	Helotiales (Is)																						
	Hyaloscyphaceae																						
	Sclerotiniaceae																					0,5	
	Leotiomycetes (ni)																						
Saccharomycetes	Debaryomycetaceae		0,6			0,6						1,3							0,7				
	Phaffomycetaceae																						
	Pichiaceae					1,7						2,4									0,5		0,5
	Saccharomycetaceae					0,7									1,7							0,6	
	Saccharomycetales (Is)					1,6						2,3								0,6			
	Saccharomycodaceae																						
Sordariomycetes	Clavicipitaceae																						
	Hypocreaceae	2,0	2,3	1,6	2,3	8,1	1,9	1,6	1,9	2,2	2,3	8,8	0,8	1,7	0,9	1,0	0,9	1,1	1,5	0,7	1,1	1,4	1,2
	Hypocreales (Is)																						
	Hypocreales (ni)																						
Taphrinomycetes	Taphrinaceae																						
Ascomycota (ni)																							
Agaricomycetes	Clavariaceae																						
	Physalacriaceae																						
	Pleurotaceae														2,5						1,0		
	Schizophyllaceae																						
	Strophariaceae																						
	Tricholomataceae																						
	Amylocorticiaceae																						
	Atheliaceae															0,6							
	Boletaceae																						
	Tapinellaceae																						
	Ceratobasidiaceae																						
	Hymenochaetales (Is)																						
	Coriolaceae																						
	Fomitopsidaceae																						
	Meruliaceae																						
	Xenasmataceae																						
	Polyporales (ni)																						
	Peniophoraceae																						
	Russulales (ni)																						
	Agaricomycetes (ni)																						
Cystobasidiomycetes	Buckleyzymaceae																						
	Symmetrosporaceae																						
Malasseziomycetes	Malasseziaceae					0,9							27,1	0,7	0,8		0,8		2,3			6,4	
	Malasseziales (ni)																						
Microbotryomycetes	Leucosporidiaceae																						
	Sporidiobolaceae					0,6						0,7			11,4								
Tremellomycetes	Cystofilobasidiaceae																						
	Mrakiaceae																						
	Filobasidiaceae																						
	Piskurozymaceae																						
	Bulleraceae																						
	Bulleribasidiaceae																						
	Tremellaceae																						
	Trichosporonaceae	89,0	88,8	91,3	90,1	32,5	89,9	88,5	88,6	83,1	90,0	34,3	60,4	89,5	71,0	91,5	88,0	90,0	87,0	87,1	89,6	84,6	90,7
Fungi (ni)		0,8	0,9		0,8	7,8	1,2	0,8		0,6	0,7	3,1		0,9	1,5		1,1	0,6	2,8	4,6	0,6		1,6
Other (below 1%)		1,7	1,9	2,5	2,0	2,6	2,4	2,1	1,2	1,1	1,4	2,7	1,2	1,3	2,2	1,8	2,6	2,5	2,4	2,7	1,9	2,8	1,7

Class	Family	23ZLK	24ZLK	25ZLK	26ZLK	27ZLK	28ZLK	29ZLK	30ZLK	31ZLK	32K	33K	34K	35K	36K	37K	38K	39K	40K	41K	42K	43K	44K	45K	46K	47K	48K	49K	50K
Dothideomycetes	Botryosphaeriaceae																												
	Capnodiales (Is)																										1,0		
	Cladosporiaceae							0,7	7,1			5,7	5,7										1,5			0,6	1,7		0,6
	Mycosphaerellaceae							1,0				8,1							1,9				0,6			0,6	1,3		
	Teratosphaeriaceae																						0,9						
	Aureobasidiaceae											1,8											1,7				0,9		
	Dothideaceae																												
	Dothioraceae								53,3																				
	Dothideales (ni)																												
	Cucurbitariaceae											1,2																	
	Didymellaceae																												
	Lentitheciaceae		0,6	0,7							0,5	3,7			1,8								3,5	0,6	0,6		3,0		
	Montagnulaceae																												
	Pleosporaceae	1,6	1,3	0,5	0,7	0,9	0,9		0,6	0,7	1,0	2,8	1,2	0,9	0,7	0,6	1,3	1,4	0,7	0,9	0,8	1,2	5,4	0,6	3,2	0,9	9,9	0,9	1,0
	Pleosporales (ni)											2,2											0,9						
	Venturiaceae																												
Eurotiomycetes	Herpotrichiellaceae								6,9			0,6																	
	Trichomeriaceae																												
	Chaetothyriales (ni)																												
	Aspergillaceae										0,6	1,5		0,8					0,8				3,2				0,6		
	Thermoascaceae	3,5	3,1	2,8	3,3	3,6	2,3	1,2	0,9	2,8	3,2	33,4	3,4	3,2	3,8	2,9	4,3	2,7	3,2	3,1	3,5	3,0	38,6	3,3	2,2	2,7	18,0	2,4	2,8
Leotiomycetes	Erysiphaceae																												
	Helotiaceae											1,0																	
	Helotiales (Is)																												
	Hyaloscyphaceae																												
	Sclerotiniaceae																												
	Leotiomycetes (ni)																												
Saccharomycetes	Debaryomycetaceae										0,9	1,9	0,9	1,0	0,7	0,7	1,0	0,9	2,2	0,7	0,8	0,8	2,4	9,2	0,5		3,5		1,0
	Phaffomycetaceae																										3,9		
	Pichiaceae											4,7			1,8		0,6	0,5			0,5		4,5	1,7	1,3	0,6	4,8	0,5	0,8
	Saccharomycetaceae											2,5		1,9				0,6											
	Saccharomycetales (Is)	0,8	0,8	0,5	1,9			0,8						1,2		0,8			1,4			0,5		0,9		3,8	3,9	0,8	
	Saccharomycodaceae																		1,4										
Sordariomycetes	Clavicipitaceae																												
	Hypocreaceae	0,9	1,2	1,1	1,7	1,5				1,3	1,4	6,6	2,0	0,9	2,1	1,1		0,5	0,7	1,6	0,7	1,0	6,2	0,7	0,6	0,9	12,1	1,2	2,0
	Hypocreales (Is)																												
	Hypocreales (ni)											4,2																	
Taphrinomycetes	Taphrinaceae																												
Ascomycota (ni)																													
Agaricomycetes	Clavariaceae																												
	Physalacriaceae																												
	Pleurotaceae																										2,0		
	Schizophyllaceae																												
	Strophariaceae																												
	Tricholomataceae																16,6										3,2		
	Amylocorticiaceae																												
	Atheliaceae																												
	Boletaceae							55,1				0,8	0,7										4,8			0,6			
	Tapinellaceae			8,8																			4,2						
	Ceratobasidiaceae																												
	Hymenochaetales (Is)																										0,6		
	Coriolaceae																												
	Fomitopsidaceae															1,4													
	Meruliaceae						1,6					0,9		1,6															
	Xenasmataceae						2,9																						
	Polyporales (ni)																												
	Peniophoraceae																												
	Russulales (ni)																	1,0									1,0		
	Agaricomycetes (ni)															3,8					1,5								
Cystobasidiomycetes	Buckleyzymaceae																												
	Symmetrosporaceae																												
Malasseziomycetes	Malasseziaceae					0,6	33,6	3,9			2,4	1,7					0,5		0,6	0,6	0,6	1,4	1,1			0,7	3,3		
	Malasseziales (ni)						2,4					0,5																	
Microbotryomycetes	Leucosporidiaceae																												
	Sporidiobolaceae						0,8																6,7				4,9	0,5	
Tremellomycetes	Cystofilobasidiaceae																		0,6										
	Mrakiaceae																												
	Filobasidiaceae											5,3									4,2						1,2		
	Piskurozymaceae																												
	Bulleraceae																												
	Bulleribasidiaceae																												
	Tremellaceae																												
	Trichosporonaceae	89,2	90,8	82,0	82,8	85,5	50,1	32,9	29,1	91,4	84,8	3,2	82,9	85,3	85,9	84,2	72,7	89,0	82,2	89,5	84,1	87,2	6,1	81,1	87,3	85,8	5,0	88,3	88,1
Fungi (ni)		2,0	0,7	1,3	6,1	5,7	2,9	1,1		0,7	2,9	4,9		1,2	0,8	1,1	1,0	0,9		0,8	0,8		6,1		2,7	0,6	13,3	2,5	0,7
Other (below 1%)		2,0	1,6	2,4	3,4	2,2	2,7	3,4	1,8	3,2	2,4	0,8	2,8	1,9	2,4	3,6	2,0	2,5	3,7	2,7	2,5	4,4	1,6	1,7	1,6	2,3	1,1	2,9	3,1

Table.1 Relative abundance of fungal classes and families in analyzed samples. Samples obtained from AD patients and healthy individuals are in gray- and cream-colored columns, respectively. The shortcuts in taxa names indicate taxa with „Incertae sedis" description („Is") or taxa that could not be specified at presented taxonomic level („ni").

CONCLUSIONS

This study provides an important insight into the fungal composition of the skin of AD patients. A higher interpersonal diversity of the mycoflora, and a clear predominance of specific taxa was observed in AD patients when compared with healthy individuals.

This work was supported by the «Iuventus Plus» grant from the Polish Ministry of Science and Higher Education (0258/IP1/2016/74)